

⑨日本国特許庁(JP)

⑩特許出願公開

⑫公開特許公報(A)

昭54—73195

⑪Int. Cl.²
C 12 D 13/00

識別記号 ⑫日本分類
1 4 6 36(2) D 532

庁内整理番号 ⑬公開 昭和54年(1979)6月12日
6760—4B

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑭トメイマイシン類の製造法

⑯特 願 昭52—140253
⑰出 願 昭52(1977)11月22日
⑱発 明 者 東出栄治
宝塚市武庫川町5番19号
同 谷田清一
京都市左京区上高野薩田町8番

地
⑲発 明 者 灰原好
大阪市東淀川区山口町342番地
の1
⑳出 願 人 武田薬品工業株式会社
大阪市東区道修町2丁目27番地
㉑代 理 人 弁理士 松居祥二

明 細 書

1. 発明の名称

トメイマイシン類の製造法

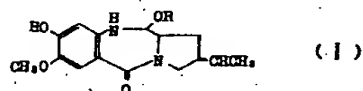
2. 特許請求の範囲

ノカルジア属に属するトメイマイシン類を生
産する菌株を培地に培養し、培養物中トメイマ
イシン類を生成蓄積せしめ、これを採取すること
を特徴とするトメイマイシン類の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は抗菌性および抗ファージ活性を有する
抗生物質トメイマイシン類の製造法に関する。

更に詳しくは、本発明はノカルジア属に属す
る抗生物質トメイマイシン類生産菌を培地に培養
し、得られた培養物からトメイマイシン類を分離、
採取するに当たり、これを水または低級アルコール
で処理すると一般式(Ⅰ)



(式中、Rは水素または炭素数1～5のアルキル

基を示す)で表わされるトメイマイシン類が採取
できる。

トメイマイシン(一般式(Ⅰ))においてRはメ
チル基の化合物)は、有馬らによつてストレプト
ミセス・アクロモゲネス・バール・トメイミセテ
イカス(*Streptomyces achromogenes*
var. tomaymyceticus)の培養物中より採取
され、公知となつた物質で(有馬ら;ザ・ジャー
ナル・オブ・アンタイバイオティクス(The
Journal of Antibiotics)25巻、43
7頁 1972年)、強い抗ファージ活性を有す
るとともに、マウス白血病細胞L-1210の増
殖を強力に阻害する(西岡ら;ザ・ジャーナル・
オブ・アンタイバイオティクス、25巻、660
1頁、1972年)。

本発明者らは、土壌などの試料より分離される
多量種の微生物について、その生産する抗生物質
を探索し、ある種の微生物が培養液中にトメイマ
イシン類を蓄積することを見出した。該微生物は、

ノカルジア属に属すると考えられる菌性質を有

し、またこの微生物より種々の変異株が得られた。これらを適宜の栄養培地および培養条件で培養することにより、トメイマイシン類を採取できることを見出し、さらに研究し、本発明を完成した。

トメイマイシン類は公知文献によれば、ストレプトミセス属に属する生産菌により製造される。これに対して、本発明によれば、ノカルディア属に属する生産菌により製造される。本発明に示した性質を有するノカルディア属に属する微生物によりトメイマイシン類が得られたことは始めての例であり、本発明方法は極めて特異な製造法であると言える。

またトメイマイシン類似の抗生物質としてアンスラマイシン、デキストロクリシン、シビロマイシンおよびネオスラマイシンAおよびBが公知であるが、それらの生産菌は下記の様に報告されている。すなわちアンスラマイシンの生産品としてストレプトミセス・ルフィネウス・パール・サーモトレランス (*Streptomyces rufineus* var. *thermotolerans*; 米国特許 3, 361

742) およびストレプトミセス・スパディコグリス (*Streptomyces spadiceogriseus*; 特開昭52-79082), デキストロクリシン生産菌としてストレプトミセス・カルバール・デキストロクリサス (*Streptomyces calvus* var. *dextrochrysus*; ザ・ジャーナル・オブ・アンチバイオティクス, 22巻, 201頁, 1969年), シビロマイシン生産菌としてストレプトスボランギウム・シビリクム (*Streptosporangium sibiricum*; アンチバイオティクス, 14巻, 963頁, 1969年), ネオスラマイシンAおよびB生産菌としてストレプトミセス・エス・ビー・6M0-916-C4 (*Streptomyces* sp. 6M0916-C4; 特開昭52-47992) がそれぞれ知られている。

以上のようにトメイマイシン類似化合物すなわちベンゾデアゼピン構造を有する抗生物質の公知の生産菌はいずれもストレプトミセス属またはストレプトスボランギウム属に属し、本発明に示さ

れるような諸性質を有する属に属する菌株がトメイマイシン類およびその類似化合物を生産することを見出したのは全く新しい知見である。

本発明に用いることができる微生物としてはたとえ特開昭52-37166 (昭和52年3月31日出願) 記載のノカルディア・エス・ビー・6C-15003株 (*Noocardia* sp. 6C-15003) が挙げられる。

以下に本菌株の菌学的諸性質を記載する。

A) 6C-15003株の菌学的諸性質

6C-15003株の菌学的諸性質をシャーリングおよびゴフツリープの方法 (インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムアティク・バクテリオロジー (International Journal of Systematic Bacteriology), 第16巻, 313頁~340頁, 1966年) に準じて検討し、28℃, 21日間にわたって観察した結果は下記の通りである。

1) 形態的特徴

基生菌糸は寒天培地および液体培地中ともに

よく伸長し、分枝する。その直径の多くは0.8~1.2μmであり、時には桿菌状または分枝した短い菌糸状に分断することがある。種々の分枝用培地上でよく生育し、気菌糸は基生菌糸上に発育するが、束状体 (50~200μm×200×1000μm) を形成し、それらの上に発育することが多い。気菌糸の形状の多くは屈曲状または直線状を示し、まれにゆるい螺旋状を示すものも見られる。成熟した培養を鏡検すると菌子が連鎖状になつていると考えられるものは少なく、それらの培養表面から採取した菌懸濁液について鏡検した所、長楕円形 (0.8~1.2×4.8~6.8μm) および棒円形 (0.8~1.2×1.0~2.0μm) の分節菌子様のものが多く観察され、電子顕微鏡による観察ではその表面は平滑であつた。

2) 菌体組成

本菌株をISP No.1の改変培地中で28℃, 6~90時間振盪培養して、菌体を集め、洗滌した。上記菌体をビー・ベッカーらの方法 (アブラ

イド、マイクロバイオロジー (Applied Microbiology), 12巻, 421頁, 1964年) およびエム・ビー・レヒバリエーの方法 (ジャーナル・オブ・ラボラトリー・アンド・クリニカル・メディスン (Journal of Laboratory and Clinical Medicine) 71巻, 934頁, 1968年) に従って菌体細胞中のソアミノピペリン酸および脂組成を検した結果、前者はメン体であること、後者はガラクトースおよびアラビノースに相当するスポットの存在が認められた。

3) 分類用培地上の顕性質

本菌株は各種培地上で、いずれも比較的良好に生育し、その基生菌糸は培養初期無色ないし淡黄色で、その後、淡黄褐色または黄褐色を示す。また種々の分類用培地中に黄色ないし黄褐色の可溶性色素を生成する。気菌糸は粉状で、一般には中程度に生育し、白色ないし黄色または淡黄褐色を示す。本菌株の各種分類用培地上における顕性状は第1表に示した通りである。

G: 中程度, 淡黄色 (20a) * ないし淡黄褐色 (20a) *, 束状体形成
AM: 豊富, 淡黄色 (20a) *
SP: なし

(イ) 寒天培地

G: 中程度, 淡黄色 (20a) * ないし黄色 (2ga) *, 束状体形成
AM: 貧弱, 白色
SP: なし

(ロ) リンゴ酸カルシウム寒天培地

G: 中程度, 淡黄色 (20a) * ないし淡黄褐色 (20a) *, 束状体形成
AM: 中程度, 白色ないし淡黄色 (20a) *
SP: なし

(ハ) 酵母エキス・麦芽エキス寒天培地

G: 中程度, 淡黄褐色 (31c) * ないし明褐色 (31a) *, 束状体形成
AM: 中程度, 白色ないし淡黄色 (20a) *
SP: なし

(ニ) オートミール寒天培地

第1表 菌C-15003株の分類用培地上の顕性質

(イ) 寒天・硝酸塩寒天培地

生育 (G): 豊富, 黄色 (31a) * ないし淡黄褐色 (31c) *, 束状体形成
気菌糸 (AM): 貧弱, 白色
可溶性色素 (SP): なしまたは微黄褐色

(ロ) グリセロール・硝酸塩寒天培地

G: 中程度, 淡黄色 (20a) *, 束状体形成
AM: 中程度, 白色
SP: なし

(ハ) ブドウ糖・アスパラギン寒天培地

G: 中程度, 淡明黄色 (3pa) * ないし明黄色 (2pa) *
AM: 貧弱, 白色
SP: 明黄色 (2pa) *

(ニ) グリセロール・アスパラギン寒天培地

G: 中程度, 淡黄色 (20a) *, 束状体形成
AM: 貧弱, 白色
SP: なし

(ホ) けん粉寒天培地

G: 中程度, 淡黄色 (20a) * ないし黄色 (2ga) *, 束状体形成
AM: 貧弱, 白色ないし淡黄色
SP: なし

(イ) ペプトン・酵母エキス・鉄寒天培地

G: 中程度, 黄色 (2ga) *
AM: なし
SP: 黄色 (2ga) *

(ロ) テロジン寒天培地

G: 中程度, 淡黄色 (20a) * ないし黄色 (30a) *, 束状体形成
AM: 中程度, 白色ないし淡黄色 (20a) *
SP: 黄褐色 (31c) *

*: カラー・ハーモニー・マニュアル, 第4版,

(コンテイナー・コーポレーション・オブ・アメリカ, 1958年発行) による色名記号

4) 生理的性質

本菌株の生理的性質は第2表に示した通りである。すなわち生育温度範囲は12℃ないし38℃

また寒天培地 (ISP, 底2) 上で気阻糸をよく
増生する温度範囲は20℃ないし35℃である。

第2表 底C-15003株の生理的性状
生育温度範囲: 12℃~38℃

気阻糸増生温度20℃~35℃

ゼラチン液化: 陽性

でん粉加水分解: 陽性

硝酸塩還元能: 陽性

ミルク・ペプトン化: 陽性

ミルク・凝固: 陰性

カゼイン分解能: 陽性

メラニン様色素形成(ペプトン・酵母エキスを鉄寒

天培地): 陰性 チロシン寒天培地: 陽性

チロシン分解能: 陽性

キサンタン分解能: 陰性

ヒポキサンタン分解能: 陰性

リゾチーム耐性: 陽性

食塩耐性: 2%

5) 各種炭素源の利用性

アリゲムおよびゴットリーブの方法(ジャー

ナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of
Bacteriology) 56巻, 107頁, 1948
年)に記載されている培地およびそれに酵母エキ
ス(デیفコ)を0.1%添加した基礎培地を用
いて、各種炭素源の利用性を検し、それらの結果
を第3表に示した。

第3表 底C-15003株の炭素源利用性

炭素源	生育	炭素源	生育
D-キシロース	+	ラフィノース	± ±
L-アラビノース	+	メリビオース	+
D-グルコース	++	1-イノシトール	-
D-ガラクトース	+	D-ソルビトール	-
D-フラクトース	++	D-マンニトール	++
L-ラムノース	+	グリセロール	- ±
D-マンノース	++	可溶性澱粉	+
シユクロース	++	対 照	-
フクトース	-		
マルトース	±		
トレハロース	+		

*: 酵母エキス0.1%添加基礎培地

注: ++: 豊富な発育

+: 比較的良好な発育

+: 発育を認める。

±: 極かに発育する。

-: 発育しない。

6) その他の諸性質

前述2)に示した方法で菌体を集め、これらを
ジェー・マーマールの方法(ジャーナル・オブ・
モレキュラー・バイオロジー (Journal of
Molecular Biology) 3巻, 208頁, 1
961年)に準じてDNAを調製し、DNAのG
-C含量を検すると約71モル%であつた。

本菌株の栄養菌糸をグラム染色すると陽性であ
つた。

以上に述べた底C-15003株の諸性質をエ
ス・エー・ワックスマン著、ジ・アクチノミセテ
ス(The Actinomycetes), 第2巻, ザ・ウ
イリアムス・アンド・ウィルキンズ・カンパニー
発行, 1961年アル・イー・ブッフアナン・
アンド・エヌ・イー・ギボンス編, バージーズ・

マニユアル・オブ・デターミネーティブ・バクテ
リオロジー (Bergey's Manual of Deter-
minative Bacteriology), 第8版, 19
74年およびその他の文献に従つて検索した。本
菌株はノカルディア(Nocardia)属のグループ
5に属すると思われるが、既知菌株の中には上
記諸性質を有する種は見出されず、新菌種と判定
された。

本菌株底C-15003株は、工業技術院衛生
1) 物工業技術研究所に申請書受理番号第3992号
として、財団法人発酵研究所にIFO-1372
6として、アメリカン・タイプ・カルチャー・コ
レクション(American Type Culture
Collection Maryland, U. S. A.) にA T
1) CC-31281としてそれぞれ寄託されている。

以上に述べた様に底C-15003株はノカル
ディア属の新種であるが、微生物の一般的性質と
して自然的または変異期によつて変異を起し得る。
たとえばX線、ガンマー線、紫外線等の放射線の
1) 照射単胞子分離、種々の薬剤を含有する培地上で

の培養、その他の手段で変異させて得られる多くの変異株、あるいは自然に得られる突然変異株等であつても、上記した菌学的性状または下記に示した様な菌学的性状との比較において実質的に別種とするに足らず、しかもトメイマイシン類を生産する性質を有するものはすべて $\text{GC}-1500$ 3株として本発明の方法に利用し得る。すなわち $\text{GC}-1500$ 3株を種々の変異処理することにより、可溶性色素をほとんど生成しないもの、基生菌糸が無色のもの、黄緑色を示すもの赤褐色ないし橙赤色を示すもの、菌糸が桿菌状または分枝した短い菌糸に分解し易いものおよび気菌糸が豊富で白色または気菌糸をほとんど増生しない変異株等が得られている。

トメイマイシン生産菌(以下、「生産菌」と略すこともある。)の培養に用いられる培地は該菌株が利用し得る栄養源を含むものなら液状でも固状でもよいが、大量を処理するときには液体培地を用いるのがより適当である。培地には生産菌が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、無機物質

、微量栄養素等が適宜配合される。炭素源としては、たとえばブドウ糖、乳糖、シロ糖、麦芽糖、デキストリン、でん粉、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、油脂類(例、大豆油、ラード油、チキン油等)その他が、窒素源としては、たとえば肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、大豆粉、コーン・ステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、綿実粉、卵白質、尿素、アンモニウム塩類(例、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなど)その他が、10
用いられる。さらにナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む塩類、鉄、マンガ

ン、亜鉛、コバルト、ニッケルなどの金属塩類、リン酸、ホウ酸などの塩類や酢酸、プロピオン酸などの有機酸の塩類が適宜用いられる。その他、15
アミノ酸(例、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、グリシン、リジン、メチオニン、プロリン等)、ペプチド(例、ジペプチド、トリペプチド等)、ビタミン類(例、 B_1 、 B_2 、ニコチン酸、 B_{12} 、VC等)、核酸類(例、プリン、ピリ

ン、ペーパーディスク法(谷田ら、ザ・ジャーナル・オブ・アンタイバイオタイクス 29巻、754頁、1976年)でアーク形成阻止帯を測定することにより検定できる。
トメイマイシン類を培養液から採取するには、5
脂溶性の天然物を採取するのに用いられる常法に従つて行うことができる。例えば、水と任意に混和しない有機溶媒、ブタノール、イソブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル、クロロホルム、エーテル等の有機溶媒で水溶液から抽出される。また、10
XAD-2(ローム・アンド・ハース社製)、ダイイオンHP-10(三菱化成社製)などの非イオン交換性樹脂、あるいは、活性炭などを吸着剤として使用し、本物質を吸着させ、メタノール水、プロパノール水、ブタノール水、アセトン水15
などにより溶出することができる。これらの方法を適宜組合せる以外に、更に、セファデックスLH-20(ファルマシア社製)やシリカゲルなどを用いるカラムクロマトグラフィーによつても精製され、場合によつては、シリカゲルなどの担体20

ミジンおよびその誘導体)等を含むものでよい。もちろん培地のpHを調節する目的で無機または有機の酸、アルカリ類、緩衝剤等を加え、あるいは消泡の目的で油脂類、表面活性剤等の適量を加えられる。

培養の手段は静置培養でも、振盪培養あるいは通気攪拌培養法等の手段を用いてもよい。大量の処理には、いわゆる深部通気攪拌培養によるのが望ましいことはいふまでもない。培養の条件は培地の状態、組成、菌株の種類、培養の手段等によつて一定しないのは当然であるが、それらは通常 20°C ~ 35°C の温度で、初発pHを中性付近に選択するのがよい。とりわけ、培養中期の温度は 23°C ~ 30°C で、また初発pHは6.5~7.5の条件が望ましい。培養期間も前記の諸条件により一定しないが、所望の抗生物質濃度が最大となるまで培養するのがよい。これに要する時間は液体培地を用いる振盪培養または通気攪拌培養の場合は2~8日間程度である。培養経過とともに生産力価の経時的変化は、フーゼT₁を試験菌とし、

を用いる薄層クロマトグラフィーも利用される。

更に具体的に一例を説明する。培養液にハイフ
ロスーパーセル(シヨンスマンヴィル社製)を加
えて通過して得た濾液に活性炭またはマクロポー
ラス吸着性樹脂等を加えて有効成分を吸着させる。
この吸着剤を回収し、これより、水を含む有機溶
媒、例えばアセトン、水、クロロホルム(4:1
:1)の混合溶媒を用いて有効成分を溶出させ、
得られた溶出液を濃縮後 n-ヘキサンで洗った後
pHを約5に調整した後、クロロホルムで抽出する。
この抽出液を NaHCO_3 水溶液、ついで水で洗浄後
脱水し、濃縮すると油状物質が得られる。これを
石油エーテルで処理すると沈殿物が生成し、これ
を回収乾燥すると黄色粉末が得られる。この粉末
はメタノール、エタノール、ブタノール、エーテ
ル、クロロホルム、酢酸エチルに可溶であるが、
水、n-ヘキサン、石油エーテルには不溶である。
このようにして得た粉末を水あるいは炭素酸が
1~5%のアルコール、すなわちメタノール、エタ
ノール、プロパノール、ブタノール、アミルアル

コールで処理すると一般式(Ⅰ)で示されるトメ
イマイシン類が得られる。

実施例Ⅰで得られたトメイマイシンは次に示す
ような物理化学的性質を有し、これらは全て公知
文献に示されたトメイマイシンの性質と一致した。

Ⅰ 融点: 145~146°C(分解)

Ⅱ 元素分析値($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ として):

測定値 C 62.85, H 6.88, N 9.01

O 21.25

計算値 C 63.14, H 6.62, N 9.21

O 21.02%

Ⅲ 分子式: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$

Ⅳ 紫外線吸収スペクトル:

$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} (\epsilon \frac{1\%}{1\text{cm}})$ 224nm (1182)

237nm(8) (985)

260nm(8) (295)

320nm (118)

Ⅴ 赤外線吸収スペクトル(nu_{Jol}):

ベースト法による主な吸収(波数)は次の
とおりである。

$\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$ 3340, 1640, 1600,
1570, 1510

Ⅵ 質量分析:

m/e 272(M^+-32), 257, 243,

229, 178

トメイマイシン類、たとえばトメイマイシンは
抗菌力を示す(有馬ら:ザ・ジャーナル・オブ・
アンチバイオタイクス 第25巻第437頁, 1
972年)ので、それら試験およびこれと同種の
細菌の殺菌剤または消毒剤として有用なものであ
る。トメイマイシン類の50~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の
メタノール含有(たとえば10%メタノール水)
水溶液とすることにより鳥カゴの消毒、実験器具
の消毒、人の手の消毒などに消毒剤として用いる
ことができる。

実施例Ⅱ

イースト・エキストラクト・マルトエキストラ
クト斜面寒天培地に培養したトメイマイシン生菌
菌ノカルデア属 C-15003(微生物研究申請
書受理番号第3992号, IFO 13726,

ATCC 31281)を200ml容三角フラス
コ内のグルコース2%, 可溶性デンプン3%, 生
大豆粉1%, コーンステイアブリカー1%, ポリ
ペプトン0.5%, NaCl 0.3%, CaCO_3
0.5%, pH7.0を含む400mlの種培地に接種
し、28°C, 48時間回転振盪機上で培養し、種
培養液を得た。得られた種培養液の100mlを種培
地500mlを含む2.5容坂口フラスコに移し、
28°C, 48時間往復振盪機上で培養した。この
培養液500mlを種培地30gを含む50g容ス
テンレススチールタンクに移し、28°C, 通気
30g/分, 攪拌280回転/分(12DPT),
内圧1kg/cm²の条件で48時間培養してタンク用
種培養液を得た。得られた種培養液を、グルコー
ス2%, 可溶性デンプン3%, 生大豆粉1%, コ
ーンステイアブリカー1%, ポリペプトン0.5
%, NaCl 0.3%, CaCO_3 0.5%, リン
酸第一カリウム1%, リン酸第二カリウム3.5
%, pH7.0を含む主培地100gを含む200
g容ステンレススチールタンクに移し、10%で

移植し、28℃、通気100ℓ/分、攪拌200回転/分(1/2DT)、内圧1kg/cm²の条件で7日間培養した。得られた培養液はフーゼットを用いるペーパーデスク検定法で10μg/mlの生産力価を示した。

このようにして得られた培養液95ℓにハイフロスパーセル(米国 ジョンスマンヴィル社製)2kgを加えよくかきまぜた後、加圧式ろ過器を用いてろ過した。ろ液75ℓをダイイオンHP-10(三菱化成)15ℓのカラムを通過させ、カラムを水45ℓ、60%メタノール水45ℓで

洗滌後、メタノール・H₂O塩酸(8:2)の混液で溶出した。活性区分をH-NaOHで中和後、析出した沈殿をろ去し、ろ液を減圧濃縮してメタノールを留去した。メタノールを留去した水溶液5ℓを再度ダイイオンHP-10カラム(3ℓ)に通過させ、10ℓの水で水洗後80%アセトン水で溶出した。活性区分を減圧濃縮後、クロロホルムで抽出し、抽出クロロホルムを減圧濃縮してエーテルを加え、析出した沈殿(570mg)を

生産力価を示すと同時に、15μg/mlの抗生物質C-15003を併産していた。

このようにして得られた培養液95ℓにハイフロスパーセル(米国 ジョンスマンヴィル社製)2kgを加えよくかきまぜた後、加圧式ろ過器を用いてろ過した。ろ液(75ℓ)をダイイオンHP-10(三菱化成)15ℓのカラムを通過させ、カラムを水45ℓ、80%メタノール水45ℓで洗滌後、メタノール・H₂O塩酸(8:2)の混液で溶出した。活性区分をH-NaOHで中和後析出した沈殿をろ去し、ろ液を減圧濃縮してメタノールを留去した。メタノールを留去した水溶液5ℓを再度ダイイオンHP-10カラム(3ℓ)に通過させ、10ℓの水で水洗後80%アセトン水で溶出した。活性区分を減圧濃縮後、クロロホルムで抽出し、抽出クロロホルムを減圧濃縮してエーテルを加え、析出した沈殿(570mg)をろ取した。このうち250mgを薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、メルクBF₂₅₅)に付し、酢酸エチル・メタノール(25:1)で展開し、

ろ取した。

このうち550mgを薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、メルクBF₂₅₅)に付し、酢酸エチル・メタノール(25:1)で展開し、Rf 0.68~0.70の活性区分をかきとり、クロロホルムメタノールで抽出して減圧濃縮、乾固するとトメイマイシン420mgが得られた。融点145~146℃(分解)

元素分析値: C₁₈H₂₀N₂O₂として

測定値 C 62.85; H 6.88; N 9.01; O 21.25%

計算値 C 63.14; H 6.62; N 9.21; O 21.02%

実施例2

実施例1で得られた培養液を接種率10%でデキストリン2.5%、コーンステイアブリーカー1.5%、ペプトン0.05%を含む主培地100ℓを含む200ℓ容ステンレススチールタンクに移殖し28℃、通気100ℓ/分、攪拌200回転/分(1/2DT)、内圧1kg/cm²の条件で4日間培養した。得られた主培養液はフーゼットを用いる検定法で10μg/mlのトメイマイシン

Rf 0.68~0.70の活性区分をかきとり、クロロホルムメタノールで抽出して減圧濃縮、乾固するとトメイマイシン218mgが得られた。融点145~146℃(分解)

元素分析値: C₁₈H₂₀N₂O₂として

測定値 C 62.95; H 6.66; N 9.05; O 21.25%

計算値 C 63.14; H 6.62; N 9.21; O 21.02%

実施例3

実施例1と同様に得られた培養液95ℓにハイフロスパーセル2kgを加えてよく攪拌した後、加圧式ろ過器を用いてろ過した。ろ液75ℓを塩酸でpH4に調整後、ジクロロメタン25ℓで3回抽出する。この抽出液を濃縮し、残渣を少量のクロロホルムに溶解する。この溶液に等量のn-ヘキサンを加えた後、シリカゲルカラムに通し、有効成分を吸着させる。これより酢酸エチルとエタノール(40:1)の混合溶液で有効成分を溶出させ、得られた抽出液を濃縮後残渣にn-ヘキサンを加え、生成する沈殿物をろ取し、クロロホルムに溶解する。この操作を2回くり返して粉末

手 続 補 正 書 自 発

昭和 52 年 12 月 28 日

特許庁長官 殿

を得た。この粉末をエタノールに溶解後冷所に放置して結晶を得た。エタノールから再結晶して淡黄色針状のトメイマイシン【(一般式(1))において、Rはエテル基を意味する)380号を得た。

融点 134~136℃

元素分析値 $C_{11}H_{13}N_2O_2$ として

理論値 C 64.13; H 6.96; O 20.10; N 8.80

実測値 C 63.87; H 7.21; O 20.55; N 8.51

1. 事件の表示

昭和 52 年特許願第 140253 号

2. 発明の名称

トメイマイシン類の製造法

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住 所 大阪市東区道修町 2 丁目 27 番地

名 称 (293) 武田薬品工業株式会社

代表者 小西新兵衛

4. 代理人

住 所

大阪市淀川区十三本町 2 丁目 17 番 85 号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

氏 名

弁理士(5844) 松居 祥二

東京連絡先(特許法規定) 電話 273-3311

東京連絡先(特許法規定) 電話 278-2219

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

1

(1) 明細書第 14 頁第 10 行の「申請書受理番号第 8992 号」を「微工研商第 8992 号」に訂正する。

(2) 同書第 21 頁第 19~20 行の「微工研商申請書受理番号第 8992 号」を「微工研商第 8992 号」に訂正する。

5

7. 添付書類の目録

(1) 微生物受託番号通知書(写)

1 通

10

15